CHO 细胞无血清培养基
技术手册 2009

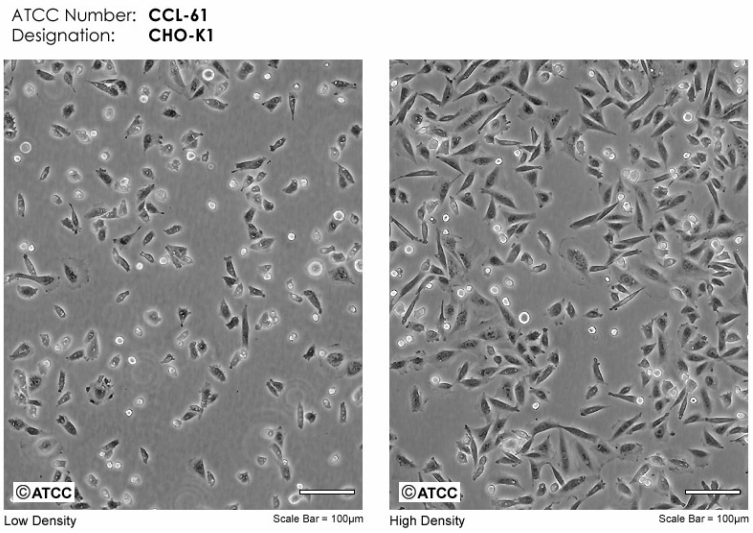
北京清大天一生物技术有限公司

BEIJING TSINGHUA SKYWING BIO TECH Co.,LTD.

2009 年 9 月

1　CHO 细胞

CHO细胞是中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary，CHO)，1957年美国科罗拉多大学Dr. Theodore T. Puck从一成年雌性仓鼠卵巢分离获得，为上皮贴壁型细胞，是目前生物工程上广泛使用的细胞系。工业生产上应用较多的是CHO-K1细胞，为转化细胞系，细胞染色体分布频率是2n＝22，系亚二倍体细胞。ATCC保存CHO-K1细胞株，编号为CCL-61，被广泛地用于重组DNA蛋白的表达。由于该细胞存在遗传缺陷，无脯氨酸合成基因，不能将谷氨酸转变为谷氨酸-γ-半醛，培养过程中需在培养基中添加L-脯氨酸才能生长。并且由于该细胞已经霍乱毒素适应，形态学有所改变。最初细胞为贴壁型细胞，经多次传代筛选后，也可悬浮生长。



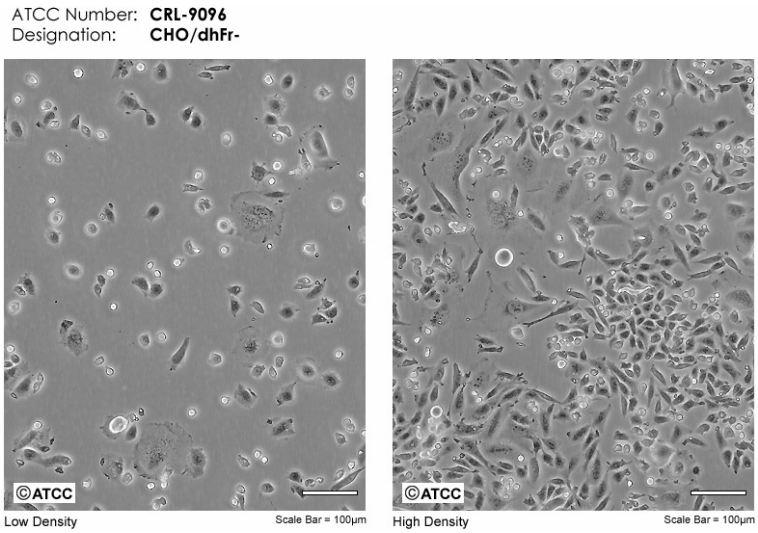
ATCC提供的CHO-K1细胞照片

CHO 细胞容易发生基因突变，也较易进行基因转染，是良好的哺乳动物基因表达宿主细胞，代表性细胞有二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase）营养缺陷型突变细胞株（CHO/dhfr$^-$）、转染谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthetase,GS）基因的 GS-CHO 细胞。

二氢叶酸还原酶是真核细胞核苷酸生物合成过程中起着重要作用的一种酶，是常用的遗传选择标记之一，它可催化二氢叶酸还原成四氢叶酸。对于 dhfr 突变体细胞而言，由于不能够合成四氢叶酸，阻断了正常核酸代谢途径，因此不能在常规培养基上生长，但若在培养基中加入次黄嘌呤（hypoxanthine）和胸苷（thymidine），则突变体细胞可以借助核苷酸的补救合成途径维持生长。利用

dhfr 基因进行筛选时，首先将重组 DNA 分子导入 $dhfr^-$ 表型的受体细胞，然后撤除原培养基中的的次黄嘌呤和胸苷，即可获得 $dhfr^+$并能表达外源基因的克隆细胞系。因此在挑选表达外源基因的阳性克隆细胞时需选用不含次黄嘌呤和胸苷的培养基。另外，氨甲喋呤（MTX）选择压力可使 CHO/$dhfr^-$ 细胞的外源基因的拷贝数扩增并得到较高水平的表达。

CHO-GS 细胞是用含单抗蛋白等的目的基因和谷氨酰胺合成酶(GS)基因标记的表达载体，转染宿主细胞 CHO，再通过 L-氨基亚砜蛋氨酸(methionine sulphoximine，MSX)等化合物选择加压促使 GS 基因和目的蛋白基因扩增，筛选获得重组细胞株，可在不含谷氨酰胺培养基中生长、增殖，可避免或减少细胞代谢过程中谷氨酰胺降解积累的氨对细胞的损伤、抑制作用。



ATCC 提供的 CHO/$dhfr^-$细胞照片

2 CHO 细胞表达系统的优势与特点

由于哺乳动物细胞结构、功能和基因表达调控的复杂性，外源基因在哺乳动物细胞中的表达与在原核生物中的表达存在较大差异，因而外源基因在哺乳动物细胞中高效表达所需的元件也不同于在原核生物细胞中的表达所需的元件。外源基因在哺乳动物细胞中的表达包括基因的转录、mRNA 翻译及翻译后蛋白质的加工等过程，如蛋白质的糖基化、磷酸化、寡聚体的形成以及蛋白质分子内或分子间二硫键的形成等比较复杂，要表达具有生物学功能的蛋白质如膜蛋白、抗体和具有特异性催化功能的酶需要在哺乳动物细胞中进行。

哺乳动物基因表达宿主细胞选择的基本原则是来源丰富、转化效率高、表达

效果好，CHO 细胞作为表达系统除具有上述的特点要求外，还有以下优势：

1）外源基因被整合到宿主染色体上后，在没有选择压力的情况下能稳定保持；

2）适合多种蛋白质的分泌表达和胞内表达，并且很少分泌自身的内源蛋白，便于下游产物分离纯化；

3）对培养基的要求较低，可在无血清培养基中培养；

4）细胞可进行贴壁培养也可进行悬浮培养，且具有较高的耐受剪切力和渗透压能力；

5）可进行高密度大量培养，进行较大规模生产时其培养量可放大到 20000L 以上，是目前应用最广泛的哺乳动物基因表达受体细胞之一。

另有研究者尝试将类胰岛素生长因子 IGF 基因和转铁蛋白基因转入 CHO 细胞获得能自身分泌必需蛋白的“超级 CHO”，无需在培养基中转铁蛋白和胰岛素，细胞可在无血清培养基（SFM）中生长良好。

3 CHO 细胞在生物制药中的应用

目前已有多种外源基因如人组织性纤溶酶原激活剂（tPA）、人促红细胞生成素（EPO）、乙肝表面抗原（HBsAg）、干扰素 γ（IFNγ）、干扰素 β（IFNβ）、白细胞介素 2（IL2）、凝血因子Ⅷ等在 CHO 细胞中得到表达。在美国已注册的大约 73 种蛋白药物生产中，应用哺乳动物细胞培养的有 35 种，CHO 细胞培养的就占 27 种，其中包括 10 种单克隆抗体。下表是以 CHO 细胞培养为基质生产的重组制品。

Table. Selected list of approved biologics produced in Chinese Hamster Ovary cell lines.

Product	Type	Therapeutic use	Manufacturer	Year of approval (FDA)
Vectibix	Anti-EGFR mAb	Metastatic colorectal cancer	Amgen	2006
Myozyme	α-glucosidase	Pompe disease	Genzyme	2006
Aldurazyme	Laronidase	Mucopolysaccharidosis I	Genzyme	2006
Orencia	Ig-CTLA4 fusion	Rheumatoid arthritis	Bristol-Myers Squibb	2005
Naglazyme	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	Mucopolysaccharidosis VI	BioMarin Pharmaceutical	2005
Luveris	Luteinizing hormone	Infertility	Serono	2004
Avastin	Anti-VEGF mAb	Metastatic colorectal cancer & lung cancer	Genentech	2004
Advate	Factor VIII (engineered)	Hemophilia A	Baxter	2003
Xolair	Anti-IgE mAb	Moderate/severe asthma	Genentech	2003
Raptiva	Anti-CD11a mAb	Chronic psoriasis	Genentech	2003
Fabrazyme	α-galactosidase	Fabry disease	Genzyme	2003
Rebif	Interferon-β	Relapsing multiple sclerosis	Serono	2002
Humira	Anti-TNFα mAb	Rheumatoid arthritis	Abbott	2002
Aranesp	Erythropoietin (engineered)	Anemia	Amgen	2001
Campath	Anti-CD52 mAb	Chronic lymphocytic leukemia	Genzyme, Bayer	2001
ReFacto	Factor VIII	Hemophilia A	Wyeth	2000
Tenecteplase	Tissue plasminogen activator (engineered)	Myocardial infraction	Genentech	2000
Herceptin	Anti-HER2 mAb	Metastatic breast cancer	Genentech	1998
Enbrel	TNFα receptor fusion	Rheumatoid arthritis	Amgen, Wyeth	1998
Benefix	Factor IX	Hemophilia B	Wyeth	1997
Follistim/Gonal-F	Follicle stimulating hormone	Infertility	Serono/NV Organon	1997
Rituxan	Anti-CD20 mAb	Non-Hodgkin's lymphoma	Genentech, Biogen Idec	1997
Avonex	Interferon-β	Relapsing multiple sclerosis	Biogen Idec	1996
Cerezyme	β-glucocerebrosidase	Gaucher's disease	Genzyme	1994
Pulmozyme	Deoxyribonuclease I	Cystic fibrosis	Genentech	1993
Epogen/Procrit	Erythropoietin	Anemia	Amgen/Ortho Biotech	1989
Activase	Tissue plasminogen activator	Acute myocardial infraction	Genentech	1987

4 无血清细胞培养基

无血清培养基的出现是培养基发展历程上的一个里程碑，其一般是在合成培养基的基础上，引入成分完全明确的或部分明确的血清替代成分，使培养基能满足动物细胞培养的要求，又可有效的克服因使用血清所引发的问题。进入 20 世纪 80 年代后，新的无血清培养基不断问世，人们经过研究发现，只要在培养基中增加某些适于细胞生长的成分，如纤连蛋白（fibronectin）、转铁蛋白（Transferrin, TRF）、胰岛素（Insulin）和表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）等，不少细胞即能在无血清供应的情况下生长，尤其是 CHO、杂交瘤、骨髓瘤细胞以及 BHK21 细胞等。某些细胞在无血清的条件下，其生长和抗体的产量甚至较有血清培养时高出数倍。

目前，无血清培养基的研究有两个方向：一是培养基中不含有任何动物来源的添加组分；二是培养基中不含有不明确的添加组分。依此可以将当前应用较多的无血清培养基归纳为以下四种：

（1)无血清培养基，为一般意义上无血清培养基，用各类可替代血清功能的生物材料配制细胞培养基，如牛血清白蛋白(BSA) 、转铁蛋白、胰岛素等生物大分子物质，以及从血清中提取的去除蛋白质的混合脂类以及水解蛋白等。其特点

是培养基中的蛋白含量较高,添加物质的化学成分不明确，其中含有大量的动物来源蛋白。

(2)无动物来源培养基，许多商业公司开发的无动物来源培养基是基于生产重组药物的安全考虑，培养基中的添加组分无动物来源，需要的蛋白来源于重组蛋白或者蛋白水解物，这些组分可以保障细胞生长及增殖的需要。

(3)无动物蛋白培养基，培养基完全不用动物来源的蛋白，但仍有部分添加物是来源于植物蛋白的水解片段或合成多肽片段等其他衍生物。此类培养基组分相对稳定，但必须添加类固醇激素和脂类前体，并且对培养的细胞是高度特异性的。

(4)化学组分限定培养基，此类培养基是目前最安全、最为理想的培养基，首先可以保证培养基批次间的一致性，其中所添加的少量动物来源的蛋白水解物、蛋白都是成分明确的组份。其特点是培养基的性质明确，有利于进行细胞培养的代谢研究，同时分离纯化也比较方便。

研究者对 CHO 细胞无血清培养基的开发比较深入，目前有多种用于 CHO 细胞无血清培养的培养基面世，形成了很多固定的商业配方，这些配方有的是专利保护的，有的是商业秘密。国外有部分优秀的无血清培养基，但价格昂贵。

CHO 细胞存在多种克隆细胞系，仅 ATCC 保存的 CHO 细胞就多达 38 种，再加上各公司或研究单位构建的细胞，其克隆细胞数量远不止这些。对于 CHO 细胞无血清培养而言，由于构建的各种高性能 CHO 细胞系不同，不同克隆细胞的营养要求也都非常的不同，对营养要求往往是个性化的。另外，CHO 细胞培养过程的不同培养阶段、重组 CHO 细胞构建的各个阶段，细胞代谢所需的营养或限制因素也是不同的，即同一细胞系在整个培养过程也需要使用不同的培养基，需要与之相对应的个性化培养基（Customed Cell Culture Medium）。

5 CHO 细胞无血清无动物组分培养基（SAF-CHO-G-004）

其实个性化培养基并不新鲜，在国外生物制药企业普遍采用个性化培养基，世界著名的生物制药公司（如Amgen、Genetech）往往和培养基企业合作，通过细胞培养基的客户定制方式，研制最适合自身细胞特点的个性化细胞培养基应用于生产实践，用于提高细胞产率和生产效率。另有数据显示，国际上的细胞培养基生产企业，个性化、定制培养基占其培养基业务的90%以上，目录培养基不足10%。

北京清大天一生物技术有限公司依托于在细胞培养基研发和动物细胞大规模培养方面具有丰富经验的研发团队，潜心研究，开发研制了多种个性化培养基，通过在生产实践中的应用已取得可喜的成果，如CHO细胞无血清无动物组分细胞培养基（SAF-CHO-G-004）就是其中之一。

5.1 CHO 细胞无血清无动物组分培养基（SAF-CHO-G-004）的特点

SAF-CHO-G-004（代码：SAF108）是北京清大天一生物技术有限公司开发的新一代CHO细胞无血清无动物组分细胞培养基，能支持多种CHO细胞的生长维持，可广泛应用于CHO细胞的无血清悬浮培养及抗体、重组蛋白的生产过程。细胞培养基产品的生产、检验严格执行GMP管理和ISO9001管理体系，符合生物制药原辅料要求，质量稳定可靠。

1）SAF-CHO-G-004细胞培养基系无血清无动物组分培养基，不含有血清替代物、动物来源蛋白等动物来源组分，化学成分明确，保证了细胞培养中原辅料的使用安全性；

2）SAF-CHO-G-004细胞培养基能支持多种CHO细胞的生长、维持，具有较为广泛的适用性；

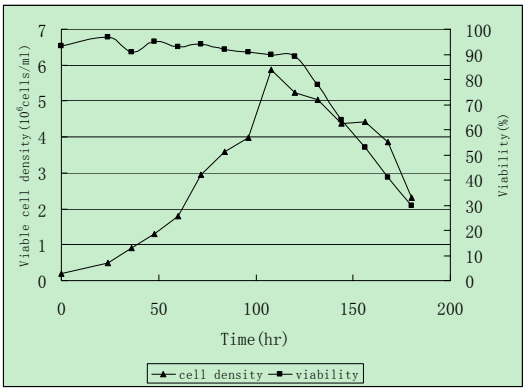
3）适用于实验研究和大规模培养应用；

4）根据用户的不同使用，可定制SAF-CHO-G-004培养基，以满足CHO/dhfr$^-$、GS-CHO等不同系统的应用需求；

5）有多种包装规格可供选择，满足不同用户的使用需求。

5.2 CHO细胞无血清无动物组分细胞培养基培养效果

使用SAF-CHO-G-004细胞培养基培养已驯化过的CHO细胞，图1是CHO细胞接种密度为2×10^5cells/ml时的细胞生长曲线，可以看到，经过3－4天的培养过程，细胞密度可提高到细胞4-5$\times10^6$cells/ml，细胞活率超过90％，细胞扩增了二十多倍。图2是细胞批培养的葡萄糖和乳酸代谢情况。图3和图4分别表示培养了96小时（4天）的CHO台盼蓝染色和细胞显微照片，细胞形态饱满、健康。



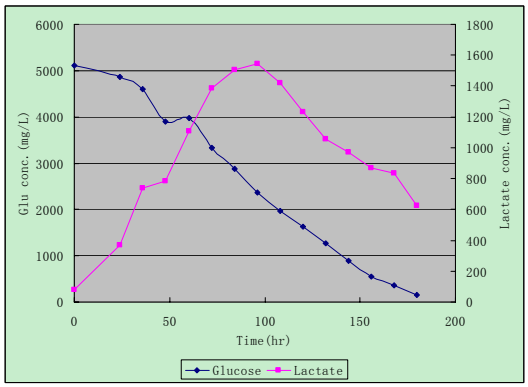
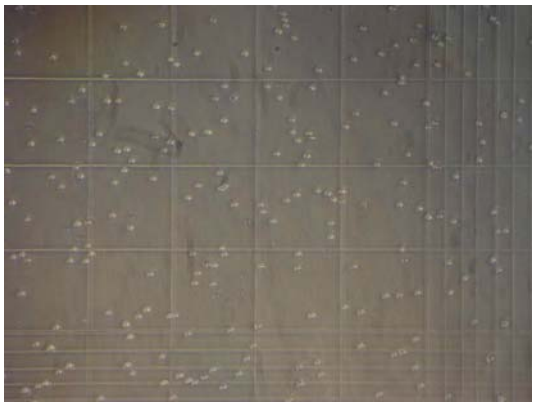


图1.CHO细胞生长曲线　　**图2. CHO细胞批培养葡萄糖和乳酸代谢情况**



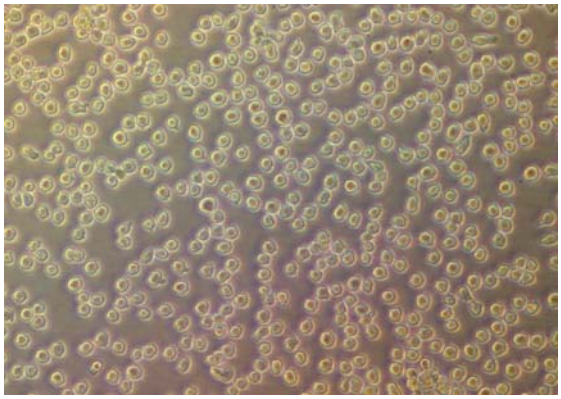


图3 培养96hr的台盼蓝染色的CHO细胞　　**图4 培养第96hr的CHO悬浮细胞**

5.3 CHO细胞无血清无动物组分细胞培养基使用说明

5.3.1 成分

无机盐	氯化钙、五水硫酸铜、七水合硫酸亚铁、氯化钾、六水合氯化镁、五水硫酸镁、氯化钠、无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠、七水合硫酸锌等
氨基酸	L-盐酸精氨酸、L-胱氨酸盐酸盐、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-盐酸组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-盐酸赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-天门冬酰胺、L-天门冬氨酸、L-盐酸半胱氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸等
维生素	维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_{12}、维生素 C、维生素 H、盐酸吡哆醇、盐酸吡哆醛、肌醇、叶酸等
其　它	无水葡萄糖、HEPES、丙酮酸钠、亚油酸、硫辛酸、胰岛素、亚硒酸钠、植物蛋白等

SAF-CHO-G-004 细胞培养基每升标示量 27.80g，含 L-谷氨酰胺、次黄嘌呤和胸苷，可根据客户使用需求定制不含谷氨酰胺或次黄嘌呤、胸苷的无血清培养基，具体的成分、标示量等详见对应产品的说明书。

5.3.2 贮存

2℃－8℃冷藏，干燥、密封、避光贮藏。【贮存期限】：暂定一年。

5.3.3 配制方法（以 1L 包装为例）

1）将一袋粉末培养基全部倒入一容器中，用少量注射用水将袋内残留培养基洗下，并入容器，加注射用水（水温 20℃-30℃）到 950 毫升，轻微搅拌溶解；

2）加入 1.9 克碳酸氢钠；

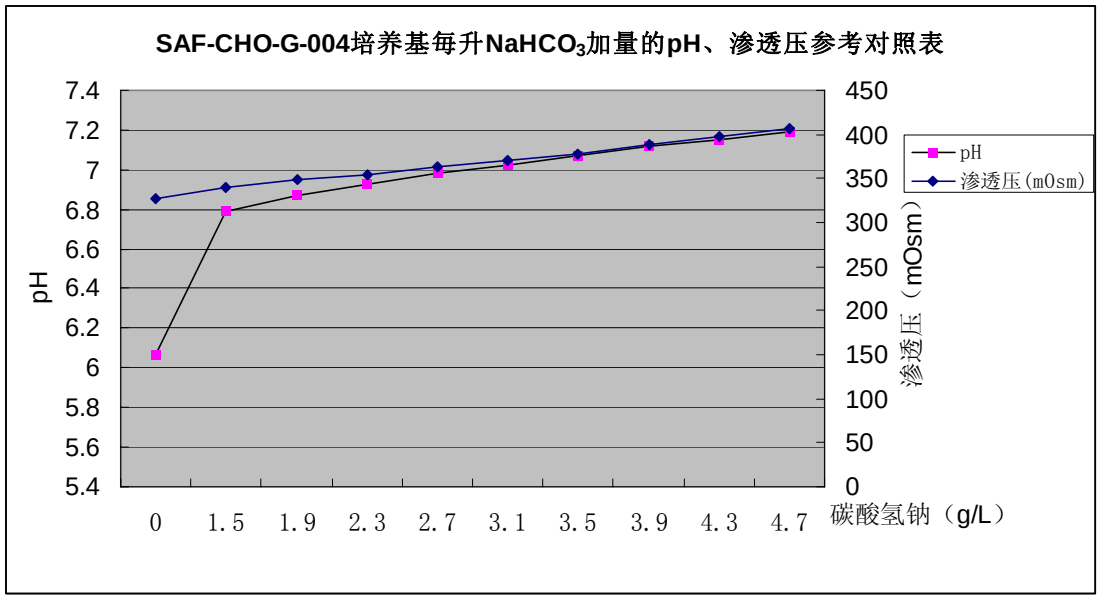
3）轻微搅拌溶解，加注射用水至 1 升；

4）如有必要，用 1mol / L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液调 pH 至所需值；

5）用 0.2μm 滤膜正压过滤除菌；

6）溶液应在 2℃-8℃下避光保存。

5.3.4 SAF-CHO-G-004 培养基不同 $NaHCO_3$ 加量的 pH、渗透压参考对照表



5.4 CHO 细胞无血清驯化

在含血清培养基中生长的 CHO 细胞可经过一定的细胞驯化过程，适应 SAF-CHO-G-004 细胞培养基，进行细胞的无血清培养。已经适应无血清培养的 CHO 细胞可直接在 SAF-CHO-G-004 中实现无血清培养培养，建议前二代的细胞密度不低于 4×10^5cells/ml。

细胞的无血清驯化过程如下：

1. 取处于对数生长期的贴壁 CHO 细胞，活率大于 95%，开始进行无血清驯化。
2. 细胞驯化可以在方瓶（T-flask）、摇瓶（shake-flask）或转瓶（spinner-bottle）中进行。
3. 将无血清细胞培养基和含血清培养基的按 1：1（V/V）的比例进行混合，接种密度为 2－4×10^5cells/ml 的细胞，在 37℃、5％CO_2 培养箱进行培养。
4. 根据细胞生长和活率情况，在降血清的每一阶段可稳定传代 1－3 代，接种密度维持在 2- 4×10^5cells/ml。
5. 逐步提高无血清细胞培养基在混合液中的比例（V/V），即降低混合液中的血清含量，传代过程的细胞接种密度仍维持为 2- 4×10^5cells/ml。
6. 直至混合液中的血清浓度降低至 0.1-0.2%，每一代的细胞活率大于 90％后，此时可将细胞完全培养在 CHO 无血清无动物组分培养基中。
7. 在 CHO 无血清无动物组分培养基中进行放大培养，建立起适应无血清无动物组分培养的 CHO 种子细胞库。